

Abstrakt

Předkládaná dizertační práce na téma „Využití kapilární a čipové elektroforézy pro klinický výzkum“ je rozdělena na dvě samostatné části. První kapitola shrnuje problematiku vývoje velmi rychlého stanovení kyseliny močové a kreatininu v lidské moči a séru prostřednictvím kapilární elektroforézy s UV detekcí, kdy bylo vyvinuto zcela originální řešení pro provádění desetivteřinové elektroforetické separace na komerčním elektroforetickém přístroji Agilent HP^{3D} CE. Separace byly prováděny v laboratorně sestavené kapiláře vytvořené spojením 9,7 cm dlouhé analytické kapiláry s vnitřním průměrem (d) 25 μm a 22,9 cm dlouhé pomocné kapiláry s d 100 μm . Vlastní elektroforetická separace probíhá na krátké separační dráze o délce 8,3 cm při současně aplikaci elektrického separačního pole o vysoké intenzitě cca 2,3 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ (při většině elektroforetických separací nepřekračuje intenzita hodnotu 1,0 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$). Spojená kapilára byla testována při praktických klinických stanoveních: i) stanovení kreatininu v lidské moči prováděné v základním elektrolytu – o složení 20 mM kyselina citronová / NaOH, pH 3,0; ii) stanovení kyseliny močové v lidské moči v základním elektrolytu, 20 mM MES / NaOH, pH 6,0. Za těchto experimentálních podmínek bylo dosaženo velmi krátkých migračních časů, 12,2 s pro kreatinin a 8,6 s pro kyselinu močovou ve vzorcích moče. Dosažená separační účinnost se pohybuje v rozmezí 1660 až 2760 teoretických pater za sekundu a limity detekce (LOD) dosahují mikromolární až submikromolární úrovně, což je dostatečné pro provádění praktických analýz. V dizertační práci je podrobně diskutována teorie separace při vysokých intenzitách elektrického pole a její praktické využití pro separaci klinických vzorků.

Druhá část dizertační práce je věnována vývoji zcela nové metodiky rychlého stanovení steviol glykosidů v potravinách a potravinových doplňcích pomocí kapilární elektroforézy

s bezkontaktní vodivostní detekcí. *Stevia rebaudiana* Bertoni je bíle kvetoucí, světlomilná, vytrvalá rostlina, která je celosvětově pěstována pro sladký extrakt izolovaný z jejích lístků. Listy stévie obsahují celou řadu diterpenických glykosidů, jejichž chemická struktura je odvozena ze společného aglykonu zvaného steviol. V současnosti je známa struktura jedenácti steviol glykosidů, z nichž majoritní zastoupení ve stévii zaujímá steviosid (cca 300 krát sladší než sacharóza) a rebaudiosid A (cca 450krát sladší než sacharóza). Steviol glykosidy se používají jako nekalorická, vysoce intenzivní sladidla v potravinových doplňcích a nápojích. Využití steviol glykosidů se v současnosti velmi rozšiřuje, což s sebou přináší požadavek pro kontrolu jejich obsahu v potravinách z důvodů možné falzifikace. Elektroforetická separace steviol glykosidů byla provedena rovněž na přístroji kapilární elektroforézy Agilent HP^{3D} CE s využitím bezkontaktní vodivostní detekce, jako alternativní techniky pro detekci látek neabsorbujících ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra. Použitá křemenná kapilára pro vlastní separace byla 33 cm dlouhá (18 cm k detektoru) s 10 μm vnitřním průměrem. Optimalizovaný základní elektrolyt byl roztok 170 mM kyseliny borité / LiOH, pH 9,0, s obsahem 0,5 % v/v INST Coating Solution. Separace byly provedeny za použití vysokého napětí +20 kV a hydrodynamického dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 100 s. Vzorky potravin a nápojů jsou před elektroforetickou analýzou pouze rozpuštěny ve vodě, zfiltrvány a finálně ředěny acetonitrilem. Migrační časy testovaných steviol glykosidů měly hodnoty 5,0 min. pro rebaudiosid A a 5,1 min. pro steviosid. Dosažená separační účinnost byla mezi 305 000 až 347 000 teoretických pater / m.